



细菌纤维素的体内降解及其组织相容性

陈艳梅¹, 奚廷斐^{1,2,3}, 郑琪⁴, 郑裕东¹, 万怡灶⁵, 高川⁵

1. 北京科技大学材料科学与工程学院, 北京 100083
2. 北京大学前沿交叉学科研究院, 北京 100871
3. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050
4. 温州医学院信息与工程学院, 浙江温州 325035
5. 天津大学材料学院, 天津 300072

摘要 为了研究细菌纤维素(BC)植入皮下组织后对其周围组织细胞产生的影响,以及由于周围细胞的长入和组织液中相关成分的直接接触,使材料在体内复杂环境下所发生的物理结构变化,以组织工程用支架基体材料细菌纤维素为研究对象,对这种材料的体内降解行为和体内组织相容性进行研究。选取成熟的 Wistar 大鼠,采取背部皮下植入的方式,将 BC 植入一定时间后,对取出的 BC 清洗干净后进行材料学检测分析,对植入部位的组织进行透射电镜观察分析。对取出的材料进行结构和形貌表征可知,随着植入时间的延长,在细胞和组织液的综合作用下,BC 分子链中部分 C—O—C 键断裂,分子间结合力降低,结晶度逐渐下降。因此,BC 在体内复杂环境的影响下会发生轻微降解。BC 与皮下组织有较好的生物相容性,材料周围组织细胞状态良好,能长入材料 30 μm 处的空间网络结构中,并且伴有血管生成。

关键词 细菌纤维素;降解;组织相容性

中图分类号 TB32

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)21-0061-06

Degradation and Histocompatibility of Bacterial Cellulose

CHEN Yanmei¹, XI Tingfei^{1,2,3}, ZHENG Qi⁴,
ZHENG Yudong¹, WAN Yizao⁵, GAO Chuan⁵

1. School of Materials Science and Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China
2. Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Peking University, Beijing 100871, China
3. School of Information and Engineering, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China
4. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China
5. School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract Bacterial Cellulose (BC) used in tissue engineering is studied in this paper, with the focus on the effects of bacterial

cellulose on rhagiocrine cell and the structural changes of materials owing to tissue cells entering. To study the in vivo degradation and histocompatibility of BC, BC with the size of 5 mm $\times$ 10 mm $\times$ 1 mm was implanted in the subcutaneous tissue back of mature Wistar rats. After a period of time, BC was taken out and cleaned out with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Phosphate Buffer Solution (PBS) and distilled water. And then the net BC taken out in different times was detected and analyzed by XRD, SEM and FTIR. At the same time, the corresponding subcutaneous tissue was fixed and observed under Transmission Electron Microscope (TEM). The interface of materials and organization tissue was observed by TEM to investigate the condition of histiocyte growing into 3D network of materials. The materials were taken out from the tissue after BC was implanted for several months. It is found that the crystallinity of BC is stepped down and C—O bond characteristic absorption peak broadened. Moreover, calcium phosphate salts were found deposited on the nano-fibril of BC after implanted for 6 months. Bacterial cellulose had good histocompatibility with subcutaneous tissue of back. Fibroblasts as well as blood vessel could migrate up to 30 μm into the fibrous network after 6 months of implant.

收稿日期: 2009-07-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2007CB936101)

作者简介: 陈艳梅, 博士研究生, 研究方向为生物医用材料, 电子信箱: cym-1223@163.com; 奚廷斐(通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: E491202361S), 研究员, 研究方向为组织工程与生物医用材料, 电子信箱: xitingfei@tom.com



Keywords bacterial cellulose; degradation; histocompatibility

0 引言

组织工程学是近年来迅速发展的一门交叉学科,主要应用在受损组织和器官的修复中^[1]。而组织工程支架材料是其中的一个重要组成部分,它主要起到细胞外基质的作用,支撑细胞的黏附和增殖,形成新的组织^[2]。根据仿生原则,组织工程仿生支架必须首先由纳米纤维来构建,这一观点已经被近期的许多实验研究证实^[3],而且已有的研究结果证实纳米纤维支架在促进细胞分化和矿化功能上明显优于传统的实壁支架^[4]。并且纤维支架空隙的大小、取向、纤维的结构和纤维直径都会影响细胞的黏附和长入,更重要地是会影响到如人工皮肤血管及骨组织工程的应用和发展^[5-6]。而且纳米纤维支架材料具有一系列作为组织工程支架材料的优点:良好的组织相容性和良好的表面活性;具有可塑性;具有三维立体结构;具有较大的内表面积。另外,最重要的一个优点是具有很好的生物可降解性,在组织形成过程中逐渐分解,不影响新形成组织的结构和功能。

细菌纤维素(Bacterial Cellulose, BC)是一种生物来源的具有纳米网络结构的高分子材料,具有上述纳米支架材料的各项优点。因此,目前它在组织工程中的应用逐渐受到重视,已应用于伤口包覆材料、功能性隔膜、人工血管等。

植入体内的生物材料作为一个外来异物,会对其周围组织细胞产生一定的影响,会改变细胞的应激状态,以及间接通过组织液介导对细胞状态产生作用。同时周围细胞的长入和组织液中相关成分的直接接触也会改变材料的结构,使材料在体内复杂环境下发生物理结构变化。因此,本研究采用与组织液和组织细胞直接接触的方式,研究 BC 在体内组织液和细胞的作用下发生一定的形貌和结构变化后对周围组织细胞生长状态的影响。

1 材料与方法

试验材料:质量均匀的原始材料 BC 由天津大学提供。将原始材料 BC 裁剪成均匀的尺寸为 5 mm×10 mm×1 mm 片状,高温高压灭菌备用。

试验动物和分组:体重为 230~250 g 的 Wistar 大鼠,雄性,由中国药品生物制品鉴定所实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2008-0004 号。动物实验环境为清洁级,人工光照时间 12 h 明,12 h 暗,温度 22~25℃,相对湿度 40%~50%。

试验分 BC 组和阴性对照组(假手术组),每组分 3 个时间点:1 月组(1 mon)、3 月组(3 mon)和 6 月组(6 mon)。

材料植入:将大鼠麻醉后,备毛,无菌操作分别将材料植入大鼠背部皮下部位。对试验大鼠前 1 mon 时间内每周称重,之后每月称重,至处死取材之日。

取材检测:植入后 1、3、6 mon 时取出背部皮下的材料,每组材料均分为两组用于不同的检测。其中一组取出后连同组织包膜立刻放入 2.5%戊二醛固定,用于透射电镜(TEM)检测。另一组取出后剥离组织包膜,分别用磷酸缓冲液(PBS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、超纯水清洗数遍,放入-80℃冰箱冷冻 24 h,然后放入-50℃冻干机冻干。分别进行扫描电子显微镜分析(SEM)和 X 射线衍射分析(XRD)检测。

2 结果与讨论

2.1 直接与组织接触作用后取出材料的表面形貌分析

不同时间点取出的植入大鼠背部皮下的材料的微观扫描电镜如图 1 所示。植入 1 mon 时,BC 的空间网络结构无明显变化,小部分纤维丝发生聚集现象。植入 3 mon 时,纤维丝出现大面积溶胀聚集,网络空隙减少,纤维丝相互缠绕,相互聚集成束,形成较宽的条带状结构^[7]。这种结构并不利于组织细胞和血管的长入。植入 6 mon 时,分散和聚集的纤维丝并

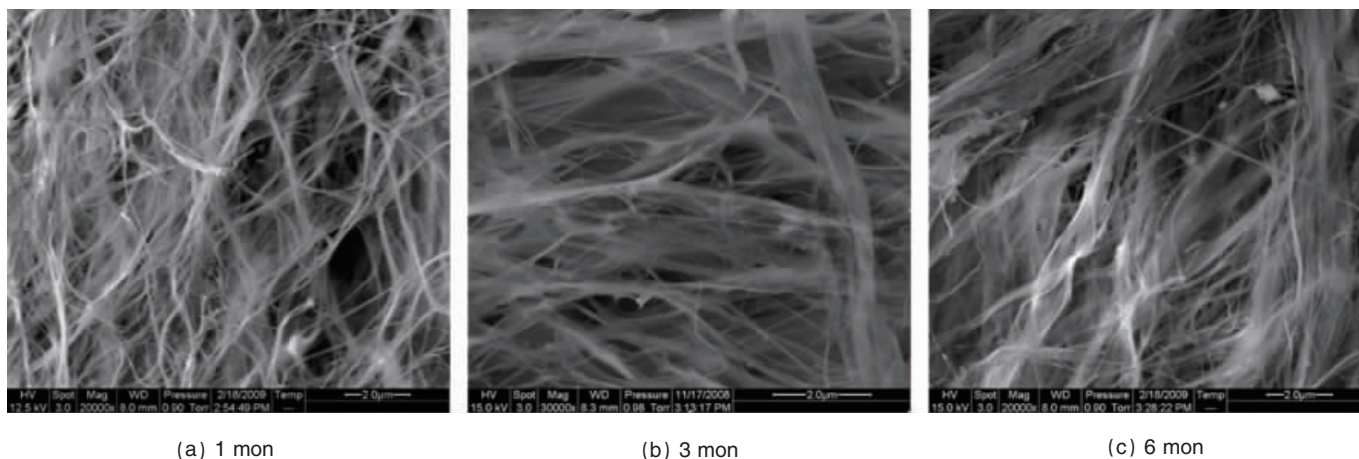


图 1 BC 植入雄性大鼠背部皮下组织不同时间后取出材料的 SEM 图

Fig. 1 SEM micrographs of BC taken out from subcutaneous tissue of back of a masculine rat at different times

2.2 直接与组织接触作用后取出材料的相组成分析

图 2 是 BC 植入皮下组织取出后的 XRD 图。可以看出, BC 的主峰是 14.70° 和 22.78° , 分别表示 (110) 面和 (200) 面。由于纯 BC 不是完全结晶的结构, 出现的两个衍射峰并不尖锐, 而且多数晶体取向以 (200) 方向为主^[8], 结晶度为 78.34%。植入皮下 1 mon 后, 材料表面有少量钙盐沉积, 查 PDF 卡片得知该物质为 α -磷酸三钙 (α -TCP)。植入 3 mon 后该钙盐消失; 而 6 mon 后, 又出现了羟基磷灰石 (HA) 和 β -磷酸三钙 (β -TCP), 但是结晶度比较低。材料植入体内后在组织液中少量水分子的作用下发生不同程度的润胀。在润胀状态下, BC 分子链的晶体结构发生改变, 分子链排列不整齐, 较疏松, 无序的非晶区结构比重增大, 结晶度降低, 分子间和分子之内氢键结合力降低^[9-10]。同时, 非晶区的游离羟基 (尤其是 C6 位上的羟基) 的氢键不断打开, 被水分子的氢键所代替, 余下的 OH 会与溶液中 $H_2PO_4^-$ 和 HPO_4^{2-} 结合形成 PO_4^{3-} , PO_4^{3-} 与少量 Ca^{2+} 结合形成磷酸钙盐。另外, 材料在初始植入大鼠背部皮下时, 作为异物会引起局部炎症, 周围的细胞因血管不够丰富而营养不足, 会有部分细胞退化, 胞内释放出大量 P 离子, 引起周围 Ca 和 P 离子失去平衡, 从而使 Ca、P 离子浓度升高, 因此形成磷酸盐沉积^[11]。植入 3 mon 时, 随着材料周围炎症的恢复, 细胞状态渐好, 血管长入, 营养丰富, 细胞内外离子平衡, 磷酸盐溶解。而植入 6 mon 后, 随着细胞的不断长入和材料溶胀破裂, 结晶度降低, 深入材料内部的细胞因血管不能及时补充营养而退化, 使周围离子浓度失去平衡, Ca、P 离子富集, 形成磷酸盐。另外, 随着植入时间的延长, BC 的晶粒取向发生改变, 逐渐趋向于以 (200) 面为主。

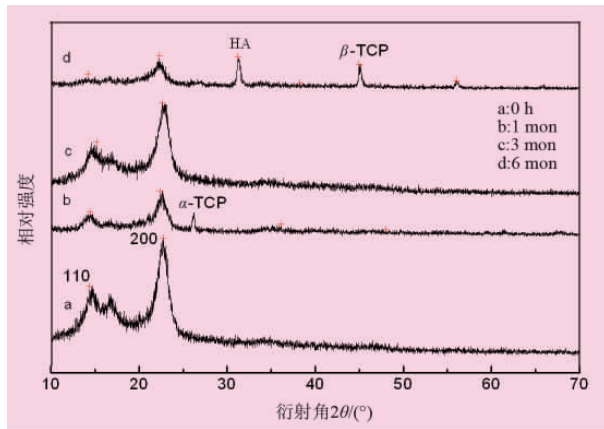
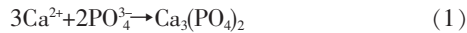


图 2 BC 植入雄性大鼠背部皮下组织不同时间后的 XRD 图
Fig. 2 XRD patterns of BC taken out from subcutaneous tissue of back of a masculine rat at different times

2.3 直接与组织接触作用后取出材料的结构分析

图 3 所示为 BC 植入皮下不同时间取出后材料的 FTIR 图, 原始材料 BC 中, 3340 cm^{-1} 处为分子间氢键引起的羟基

的伸缩振动峰; 2920 和 2853 cm^{-1} 处为不对称伸缩或环氧环的 C—H 伸缩振动峰及分子内氢键; $1700\sim 1060\text{ cm}^{-1}$ 处为 C—O 伸缩振动峰。材料植入大鼠体内后会吸附组织液中的水分子, 总体上—OH 的伸缩振动峰均会增强。材料植入皮下 1 mon 时, 1370 cm^{-1} 的 C—H 弯曲振动峰减弱; 由于此时材料已有轻微钙化, 因此出现宽化了的 1030 cm^{-1} PO_4 峰, 但是它与 1060 cm^{-1} 的 C—O 伸缩振动峰连在一起。材料植入皮下 3 mon 时, OH 峰和 C—O 伸缩振动峰均有所增强, 同时出现了 1650 cm^{-1} OH 基团弯曲振动峰。由于钙盐溶解消失 (XRD 图所示), P 离子保持组织液中离子平衡, PO_4 基团峰消失, C—O 键峰增强。植入皮下 6 mon 时, 由于 BC 非晶化程度较高, 以及组织液中水分子的吸附而引起的静电诱导效应, 使分子中电荷分布变化, 改变振动的键力常数, 基团振动频率在一定范围内变化, 使峰位移动宽化。

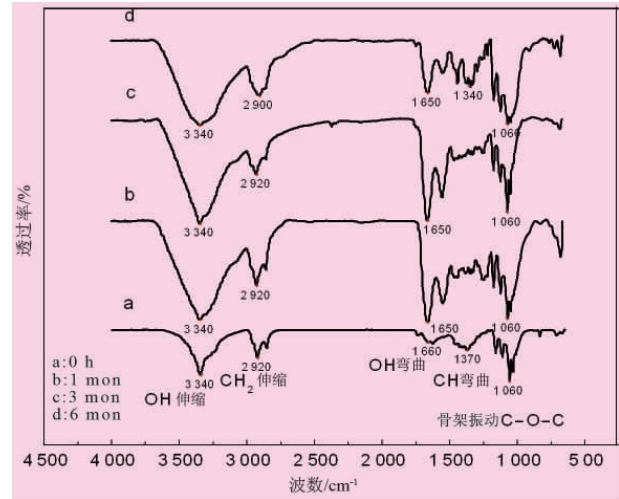


图 3 BC 植入雄性大鼠背部皮下组织不同时间的 FTIR 图
Fig. 3 FTIR patterns of BC taken out from subcutaneous tissue of back of a masculine rat at different times

2.4 与大鼠背部皮下组织接触作用后 BC/组织界面分析

BC 植入大鼠背部皮下 1 mon 后, 部分纤维细胞无规律地长入材料浅层内, 且状态良好, 如图 4(a) 和图 4(b) 所示。材料内部结构松散, 失去原来规则的空间网络, 纤维丝有断裂和聚合现象, 如图 4(c) 所示。观察到界面处巨噬细胞内部吞噬的异物 (溶酶体中的黑点), 有可能是材料破碎产生的碎片。

BC 植入雄性大鼠皮下 3 mon 后, BC 周围纤维细胞状态良好, 细胞突起能首先深入到 $1\text{ }\mu\text{m}$ 左右的网络空隙中, 然后细胞推挤着网络结构往 BC 的内部伸展, 能长入 BC 内部 $30\text{ }\mu\text{m}$ 左右; 但在 $50\text{ }\mu\text{m}$ 左右处有细胞碎片, 无血管痕迹 (图 5)。说明在 3 mon 内的某个时期细胞已经能深入到材料更深部位, 但由于血管不能在深处形成, 造成细胞无法供养, 无法长期生存。皮下植入后, 由于细胞从不同部位向材料内部伸展, 不可避免的使部位纤维丝被截断破碎成大小不等的小团

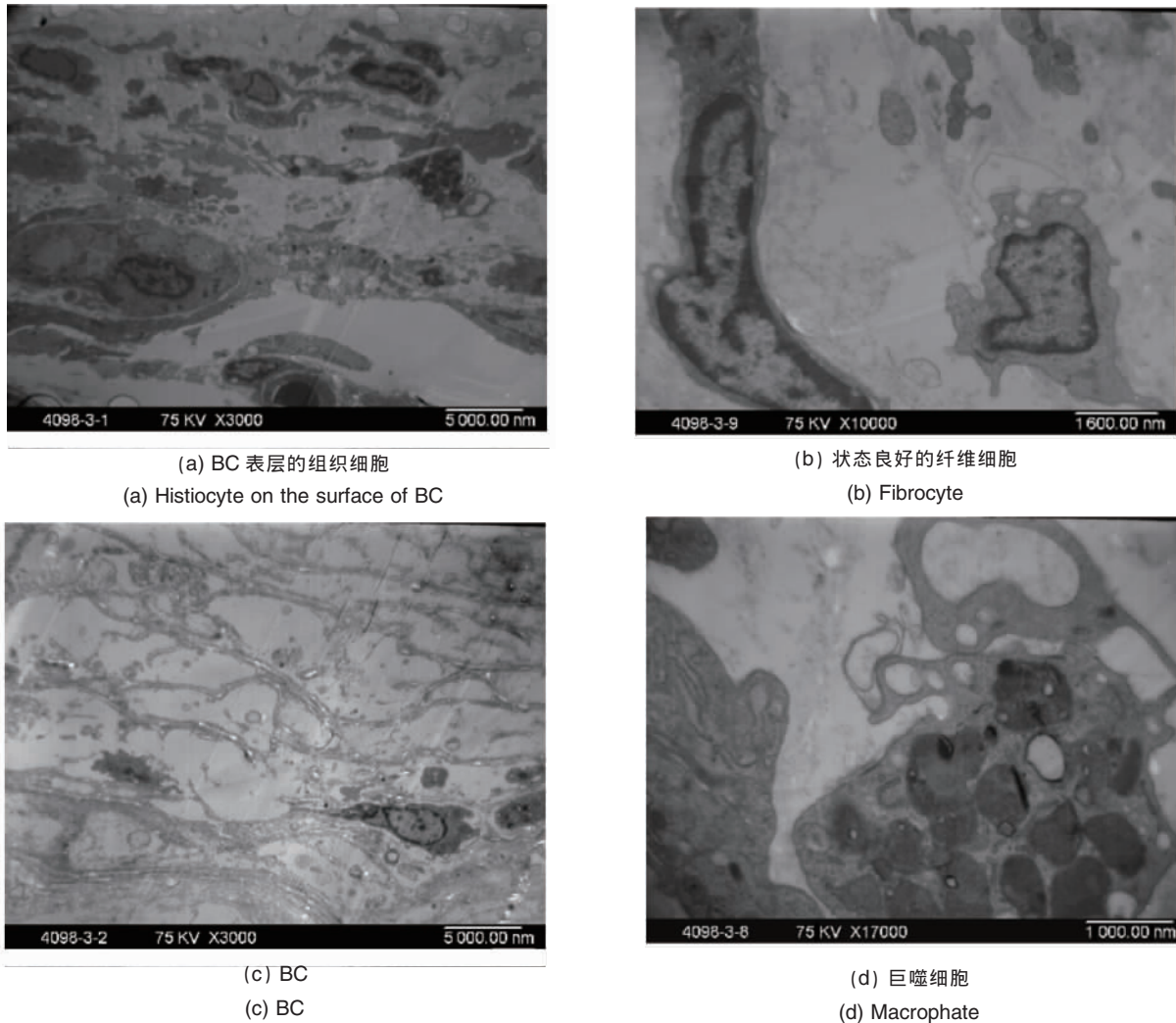


图 4 BC 植入雄性大鼠背部皮下组织 1 mon 后材料/组织界面 TEM 图

Fig. 4 TEM micrographs of BC/tissue interface of subcutaneous tissue of back of a masculine rat after 1 month

块,有的甚至被细胞吞噬,进入胞浆内,周围组织细胞状态良好,有血管长成,如图 6 所示。Backdahl 等^[12]在体外模拟试验中将人平滑肌细胞与 BC 共培养后发现,2 周内细胞便可长入 BC 的疏松多孔的空间网络结构中 10 μm 左右处,共培养体系中加入血小板衍生生长因子 (Platelet Derived Growth

Factor,PDGF) 后,1 周就发现细胞长入材料内部 20 μm 处,2 周可长入 40 μm 处,而被压紧实的材料一面没有发现材料的长入。

BC 植入雄性大鼠皮下 6 mon 后,组织中纤维细胞状态良好,突起伸展,分泌胶原,且能长入材料不均匀的空隙,血管

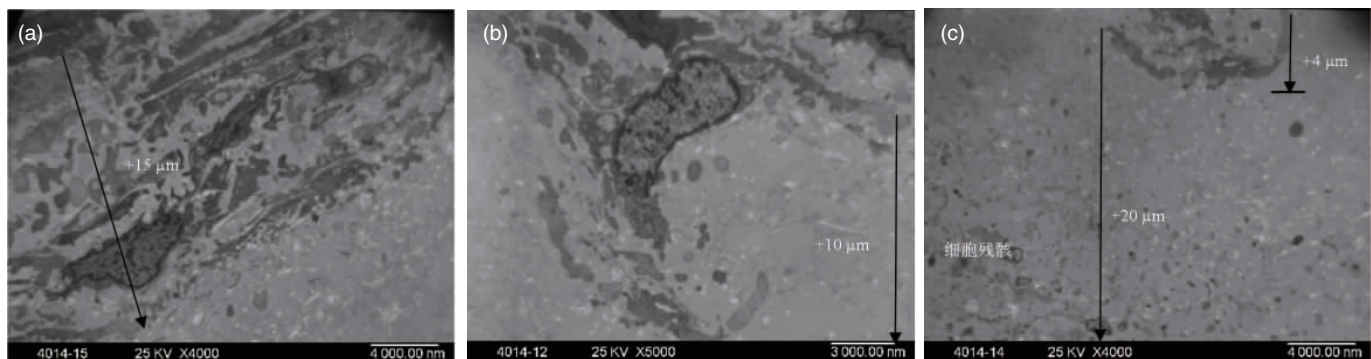


图 5 BC 植入雄性大鼠背部皮下 3 mon 后材料/组织界面 TEM 图

Fig. 5 TEM micrographs of BC/tissue interface of subcutaneous tissue of back of a masculine rat after 3 months

注:图(a)和(b)为深入到 BC 内部 30 μm 左右处的纤维细胞,(c)为 50 μm 左右处的细胞碎片

Notes: Figures (a) and (b) show the fibrocyte at about 30 μm and (c) shows the cell debris at about 50 μm inner of BC

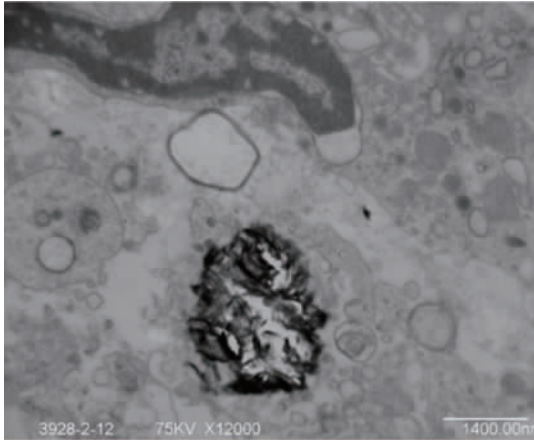


图6 BC植入雄性大鼠背部皮下3mon后被细胞吞噬的材料碎片(TEM图)

Fig. 6 Fragments of BC swallowed by cells after BC were implanted in subcutaneous tissue of back of a masculine rat for 3 months (TEM)

长入数量较植入3mon时多,且少见血管内皮细胞肿大现象。细胞长入的材料部分区域,如图7所示。

目前,可降解支架材料引起了研究者的高度重视。Higgins等^[13]研究了PGA和PLA的体外降解产物会阻止细胞的增殖,引起与组织的严重反应。而对于BC的体内外降解行为还没有系统的研究,只是得出纤维素类材料比较难降解的结论^[14]。同时由于体内缺乏切断 β -1,4间的水解酶,因此BC在体内是不能被酶解的。然而,由于体内复杂的环境会使BC的高度有序结构发生部分物理转变,从而使BC的部分转变结构发生降解^[15]。另外,应考虑由细胞的作用引起的材料降解问题,只是降解的时间和材料结构性能变化比较难控制^[12]。

从植入体内一定时间后取出材料的结构变化分析,随着植入时间的延长,BC的晶粒取向以(200)晶面为主,纤维丝表面有磷酸三钙沉积,磷酸三钙与组织中水分子发生反应生成低结晶度的HA。由BC的FTIR图谱分析可知,BC结晶度的降低是由BC中活泼羟基与水分子相互作用引起。BC分子链中C—O—C键有部分断裂,与水分子结合,形成新的羟基。因此,OH基团和C—O键的吸收峰强度均增强。



图7 BC植入雄性大鼠背部皮下组织6mon后材料/组织界面TEM图

Fig. 7 TEM micrographs of BC/tissue interface of subcutaneous tissue of back of a masculine rat after 6 months

注:图(a)和(b)为纤维细胞突起深入BC内部15 μm左右处,(c)为状态良好的纤维细胞和血管

Notes: Figures (a) and (b) show the fibrocyte entering into about 15 μm inner BC network and (c) shows the fibrocyte and blood vessel

材料植入动物体内组织中后,首先与材料相互作用的是蛋白质。部分蛋白质与材料的结合仅需几秒或几分钟,并且它的吸附和解吸附始终处于动态^[16]。而细胞随后会选择性的黏附在已吸附有蛋白质的材料上,这样细胞在材料表面有了支点后便开始改变细胞支架结构,在材料表面伸展和迁移。而三维网络结构的材料为细胞向材料内部伸展迁移提供了前提条件,活力较强的细胞便会逐渐伸展迁移至材料内部,但是由于本研究中所用的材料网络结构的空隙尺寸在纳米范围内,远小于细胞的大小,因此不利于细胞的长入。大量细胞之间相互作用产生细胞因子和生长因子是细胞生存的一个必要条件,也在材料与宿主反应中起重要作用^[17]。另外新血管的不断形成才会使长入材料的细胞状态良好。同时还会使因植入而造成的创伤不断愈合^[18]。而本研究中能够长入材料的细胞数量很少,因此导致部分细胞不能长期生存下来。

没有慢性炎症是支架材料成败的一个关键因素。手术愈合和炎症消除的关键是材料周围组织中血管的形成。材料周围组织中要首先形成足够的毛细血管,以保证材料周围及长入材料内部的细胞的营养,使材料与组织不断融合,才能逐渐消除材料周围炎症,使组织细胞正常生存^[19]。

3 结论

1) BC与皮下组织有较好的生物相容性,材料周围组织细胞状态良好,能长入材料几十微米处的空间网络结构中,并且伴有血管生成。

2) 在细胞和组织液的综合作用下,BC的结晶度逐渐下降,C—O和C—H键吸收峰宽化,并且峰强提高。因此,为BC不仅与皮下组织有较好的生物相容性,而且它在体内具有较低程度的降解。

参考文献 (References)

- [1] Nasseri B A, Vacanti J P. Tissue engineering in the 21st century[J]. *Surgical Technology International*, 2002, 10: 25-37.
- [2] Godbey W T, Atala A. In vitro systems for tissue engineering [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 961: 10-26.
- [3] Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W E, *et al.* Electrospun nanofibers: Solving global issues[J]. *Materials Today*, 2006, 9(3): 40-50.
- [4] Woo K M, Juna J H, Chen V J, *et al.* Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization[J]. *Biomaterials*, 2007, 28 (2): 335-343.
- [5] Bhattarai S R, Bhattarai N, Yi H K, *et al.* Novel biodegradable electrospun membrane: Scaffold for tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2005, 25: 2595-602.
- [6] Yang S F, Leong K F, Du Z, *et al.* The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors [J]. *Tissue Engineering*, 2001, 7: 679-689.
- [7] Nakagaito A N, Iwamoto S, Yano H. Bacterial cellulose: The ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites[J]. *Applied Physics A*, 2005, 80: 93-97.
- [8] Watanabe K, Tabuchi M, Morinaga Y, *et al.* Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture [J]. *Cellulose*, 1998, 5: 187-200.
- [9] Mormann W, Michel U. Hydrocelluloses with low degree of polymerization from liquid ammonia treated cellulose [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2002, 50: 349-353.
- [10] Rousselle M A, Nelson M L. Reactivity and fine structure of cotton mercerized in sodium hydroxide or liquid ammonia [J]. *Textile Research Journal*, 1976, 46: 648-653.
- [11] Wang H, Eliaz N, Xiang Z, *et al.* Early bone apposition in vivo on plasma-sprayed and electrochemically deposited hydroxyapatite coatings on titanium alloy[J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 4192-4203.
- [12] Backdahl H, Helenius G, Bodin A, *et al.* Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells [J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 2141-2149.
- [13] Higgins S P, Solan A K, Niklason L E. Effects of polyglycolic acid on porcine smooth muscle cell growth and differentiation [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2003, 67A(1): 295-302.
- [14] Martson M, Viljanto J, Hurme T, *et al.* Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat[J]. *Biomaterials*, 1999, 20(21): 1989-1995.
- [15] Hayashi T. Biodegradable polymers for biomedical uses [J]. *Progress in Polymer Science*, 1994, 19: 663-672.
- [16] Elwing H. Protein adsorption and ellipsometry in biomaterial research [J]. *Biomaterials*, 1998, 19: 397-406.
- [17] Yang G P, Lim I J, Phan T T. From scarless fetal wounds to keloids: Molecular studies in wound healing[J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2003, 11: 411-418.
- [18] Leask A, Abraham D J. TGF-beta signaling and the fibrotic response[J]. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2004, 18: 816-827.
- [19] Sieminski A L, Gooch K J. Biomaterial-microvasculature interactions[J]. *Biomaterials*, 2000, 21: 2233-2241.

(责任编辑 吴晓丽)

·学术动态·



“第 13 届反应堆数值计算与粒子 输运学术会议”征文

由中国核学会主办,西安交通大学承办的“第 13 届反应堆数值计算和粒子输运学术会议暨 2010 年反应堆物理会议”将于 2010 年 7 月在西安市举行。会议主题是:自主创新,协作共赢;探索先进技术,培养一流人才,推进核电自主化。会议现面向广大相关科技工作者征稿。

会议的征文范围主要包括:粒子输运(扩散)理论及数值方法,反应堆物理分析软件与核数据库,反应堆物理试验和运行分析,反应堆核设计及燃料管理,辐射源项及屏蔽,中子动力学、物理-热工耦合计算及安全分析,相关多学科交叉与应用。征文截止日期:2010 年 3 月 31 日。

联系方式:网址:<http://necp.xjtu.edu.cn>;地址:陕西省西安市咸宁西路 28 号 西安交通大学核科学与技术学院(710049) 吴宏春,曹良志;电话:029-82663285,13991280119;传真:029-82667802;电子信箱:conference@necp.xjtu.edu.cn。